

Schnelle AST durch Nanofluidik

Neue Möglichkeiten für antimikrobielle Empfindlichkeitstests (AST)

Warum sollten wir antimikrobiellen Resistenzen Beachtung schenken?

Seit vielen Jahren warnt die Weltgesundheitsorganisation (WHO) vor der zunehmenden Bedrohung durch antimikrobielle Resistenzen (AMR) [1]. Das Auftreten und die rasche Ausbreitung resistenter Bakterien stellt eine echte Gefahr dar: Sie ist in fast allen Ländern der Welt zu beobachten und betrifft alle Patiententypen.

Die Fähigkeit, sich an ihre Umgebung anzupassen, ist eine natürliche Eigenschaft von Bakterien. Die Geschwindigkeit, mit der sie sich an Antibiotika anpassen und Resistenzen entwickeln, hängt jedoch eng mit dem übermäßigen Einsatz dieser Medikamente zusammen. Und das Tempo dieser Anpassung ist besorgniserregend. Aufgrund des weitverbreiteten Einsatzes von Breitband-Antibiotika, der unsachgemäßen Verschreibung von Antibiotika bei nicht-bakteriellen Infektionen, unzureichender Diagnostik und fehlender Stewardship-Programme ist die Antibiotikaresistenz ein immer größer werdendes Problem [2, 3].

Alarmierende Stimmen sind in den letzten Jahren lauter geworden – und das aus gutem Grund. Wenn die uns derzeit zur Verfügung stehenden Antibiotika ihre Wirksamkeit bei der Behandlung bakterieller Infektionen verlieren, könnten einfache medizinische Verfahren lebensbedrohlich werden. Mit anderen Worten: Infek-

tionen, die derzeit behandelbar sind, könnten außer Kontrolle geraten und die Kraft der verfügbaren Medikamente schwächen. Es ist unsere Pflicht, den Einsatz von Antibiotika zu rationalisieren und Maßnahmen zu ergreifen, um ihren Missbrauch zu vermeiden, bevor ihre Wirksamkeit nachlässt und die Bakterien den Kampf gewinnen [4]. Die Rationalisierung des Antibiotika-Einsatzes ist

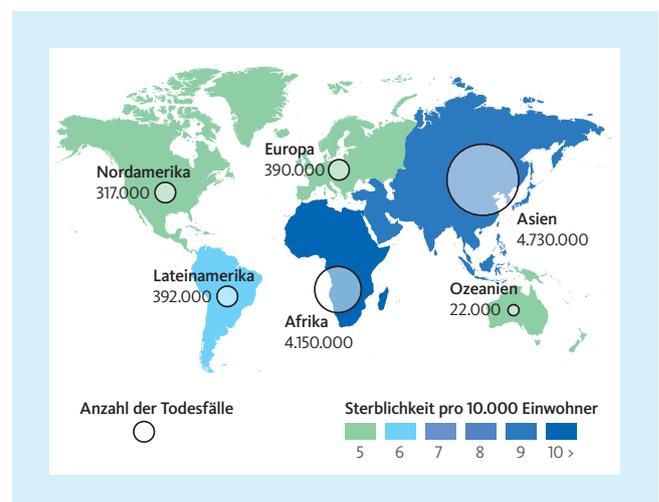


Abb. 1 AMR kennen keine Grenzen. Wenn nicht bald weltweit wirksame Maßnahmen ergriffen werden, könnten AMR bis 2050 weltweit für 10 Millionen Todesfälle verantwortlich sein [2].

auch im Hinblick auf ihre Nebenwirkungen von Bedeutung: Antibiotika greifen auch die nützliche Bakterienflora in unserem Körper an, was die Anfälligkeit des Patienten für neue Infektionen erhöhen kann. Und nicht zuletzt investieren die pharmazeutische Industrie und die Biotechnologieunternehmen weniger stark in die Forschung und Entwicklung neuer Antibiotika [5].

Die Rolle der Diagnostik bei der AMR-Bekämpfung

Die Diagnostik spielt eine wichtige Rolle bei der rationalen Verschreibung von Antibiotika. Die bekannten antimikrobiellen Empfindlichkeitstests (AST) sind zuverlässige Instrumente für die phänotypische Bestimmung der Antibiotikaresistenz [6]. Bakterienkulturen werden in der Regel in spezialisierten mikrobiologischen Laboren durchgeführt. Die meisten der uns heute zur Verfügung stehenden AST-Methoden werden bereits seit Jahrzehnten angewandt. Sie basieren auf der Erstellung von Antibiogrammen durch die Überwachung der Fähigkeit von Bakterien, in einer spezifischen Umgebung zu wachsen (d. h. Exposition gegenüber Antibiotika).

Die Notwendigkeit einer Kultur über Nacht vor der eigentlichen AST ist in akuten Situationen allerdings einer der kritischen Punkte. Diese verzögerte Verfügbarkeit der AST-Ergebnisse führt zu einer späten klinischen Diagnose. Das wiederum führt dazu, dass bei Verdacht auf bakterielle Infektionen immer wieder eine empirische Therapie eingesetzt wird. Eine weitere Folge dieser verlängerten Diagnosezeit ist der Einsatz von Breitband-Antibiotika, um die Möglichkeit auszuschließen, dass die Infektion durch multiresistente Bakterien verursacht wird. Schätzungen zufolge sind etwa 30% der Verschreibungen in Arztpraxen und Notaufnahmen unnötig, was sich ändern ließe, wenn schnellere Diagnoseverfahren zur Verfügung stünden [7].

Die Entwicklung neuartiger AST-Methoden mit dem Schwerpunkt auf einem schnelleren Ergebnis ist der Schlüssel zu fortschrittlichen Diagnoseinstrumenten. Ohne die Qualität zu beeinträchtigen, würden diese Lösungen die erforderliche Orientierungshilfe für die Behandlung und schließlich die Verschreibung von Antibiotika bieten.



Abb. 2 Die derzeitigen AST-Methoden sind oft zeitaufwendig und erfordern Fachwissen.

Aktuelle Herausforderungen der AMR und verfügbaren AST-Methoden

- Ständig steigende Resistenzraten, wodurch Antibiotika ihre Wirkung verlieren und die Behandlungsmöglichkeiten eingeschränkt werden.
- Es werden zu wenige neue Antibiotika entwickelt.
- Die derzeitigen AST-Methoden sind mit einer langen Analysezeit verbunden und erfordern ein umfassendes Fachwissen.
- Die Interpretation von AST-Ergebnissen aus einem mikrobiologischen Labor erfordert spezifische und aktuelle Kenntnisse.
- Der Mangel an diagnostischen Alternativen macht die empirische Therapie in vielen Bereichen zum Standard. Die empirische Therapie beruht auf der Verschreibung von Antibiotika, die für den Patienten auf der Grundlage statistischer Risiken wirksam sind, was zur Bekämpfung der Antibiotikaresistenz vermieden werden sollte.

Genotypisierung versus Phänotypisierung

Bei genotypischen AST werden Methoden wie die sequenzspezifische PCR-Amplifikation eingesetzt, die mit hoher Sensitivität und Spezifität Resistenzgene identifiziert. Genotypische Tests haben jedoch einige Nachteile. Sie erfordern nicht nur fortgeschrittenes Fachwissen und eine spezielle Ausrüstung, sondern können darüber hinaus aufgrund ihrer Konzentration auf die genetische Sequenz der Bakterien keine neuen Resistenzmechanismen aufdecken. Außerdem führt das Vorhandensein von Resistenzgenen nicht immer zu einer phänotypischen (tatsächlichen) Resistenz.

Um Ergebnisse zu erzielen, die einen maximalen Mehrwert für den behandelnden Arzt bieten, liegt der Fokus auf der Entwicklung neuer phänotypischer AST-Methoden. Der Vorteil des phänotypischen Ansatzes gegenüber der genotypischen Analyse besteht darin, dass er nicht auf ein im Voraus bekanntes Merkmal (wie ein Resistenzgen) abzielen muss, sondern sich auf das Verhalten des Bakterienstamms in einer realen Umgebung stützt. Indem das tatsächliche Resistenzprofil der in der Probe vorhandenen Bakterien getestet wird, ist es möglich, auf der Grundlage des die Infektion verursachenden Stammes verwertbare Ergebnisse zu erzielen.

Genotypische vs. phänotypische Charakterisierung von Bakterien

Der Genotyp ist die Erbinformation eines Organismus, d. h. die Gesamtheit seiner Gene. Der Phänotyp bezieht sich auf die Gesamtheit der beobachtbaren Merkmale eines Individuums, die vom Genotyp und der Umwelt abhängen.

Während genotypische Analysemethoden auf die Identifizierung von Genen eines Organismus abzielen, analysieren phänotypische Methoden die vom Organismus tatsächlich exprimierten Merkmale. Nanofluidik-basierte AST-Methoden können daher ebenso wie kulturbasierte Methoden als phänotypische Analysemethoden eingestuft werden, da das Ergebnis von der Reaktion der Bakterien auf bestimmte Antibiotika abhängt – ihrem tatsächlichen Resistenzprofil.

Nanofluidik trifft AST

Herkömmliche AST-Methoden erfordern zur Durchführung Bakterienkolonien. Das Ergebnis kann erst abgelesen werden, wenn sich eine Kolonie von 10^7 Zellen gebildet hat, was angesichts der natürlichen Wachstums- und Teilungsrate von Bakterien in der Regel Kulturen über Nacht voraussetzt. Der Einsatz von Nanofluidik ermöglicht die Messung des Bakterienwachstums, bevor sich eine Bakterienkolonie bildet. Das Wachstum wird als Längenausdehnung einzelner Zellen gemessen und nicht als die Zeit, bis sie eine sichtbare Kolonie bilden. Ergebnisse können durch Nanofluidik also im Echtzeitmaßstab des bakteriellen Zellwachstums erzielt werden.

Ein weiterer Vorteil dieser Methode ist, dass eine Bakteriurie deutlich schneller als mit herkömmlichen Kulturen nachgewiesen werden kann. Die Vorteile des Ausschlusses negativer Bakteriurie-Proben im Hinblick auf die Einsparung von Antibiotikabehandlungen liegen auf der Hand.

Die Anwendung der Nanofluidik in der Mikrobiologie öffnet die Tür zur Durchführung von AST an einer einzelnen Zelle. Die Miniaturisierung der Bakterienkulturen verkürzt die Zeit enorm, bis die Auswirkungen von Antibiotika auf Bakterienzellen beobachtet werden. Dieses Konzept bringt uns so der Entwicklung von Instrumenten näher, die eine rasche Unterstützung bei der Diagnose und Behandlung von bakteriellen Infektionen bieten [8].

Wie funktioniert das System?

Das Herzstück des AST-Analysesystems ist ein Nanofluidik-Chip, der eine Reihe von Nanokanälen enthält, die an einem Ende teilweise geschlossen und am anderen Ende offen sind, wo sie mit einem zentralen Strömungskanal verbunden sind [9]. Der Probenfluss wird durch den zentralen Kanal und die einzelnen Nanokanäle geleitet, die nach dem Zufallsprinzip mit den Bakterien in der Probe besiedelt werden. In jedem Nanokanal bleibt nur ein Bakterium oder eine sehr begrenzte Anzahl von Bakterien gefangen, da der Fluss durch den Nanokanal teilweise blockiert wird, wenn er eine Zelle eingefangen hat.

Nach diesem Beladungsschritt wird der Probenfluss durch einen Zufluss von Wachstumsmedium ersetzt. Analog zum Probenfluss fließt das Wachstumsmedium durch den zentralen Kanal und die einzelnen Nanokanäle und bietet nun eine geeignete Wachstums-

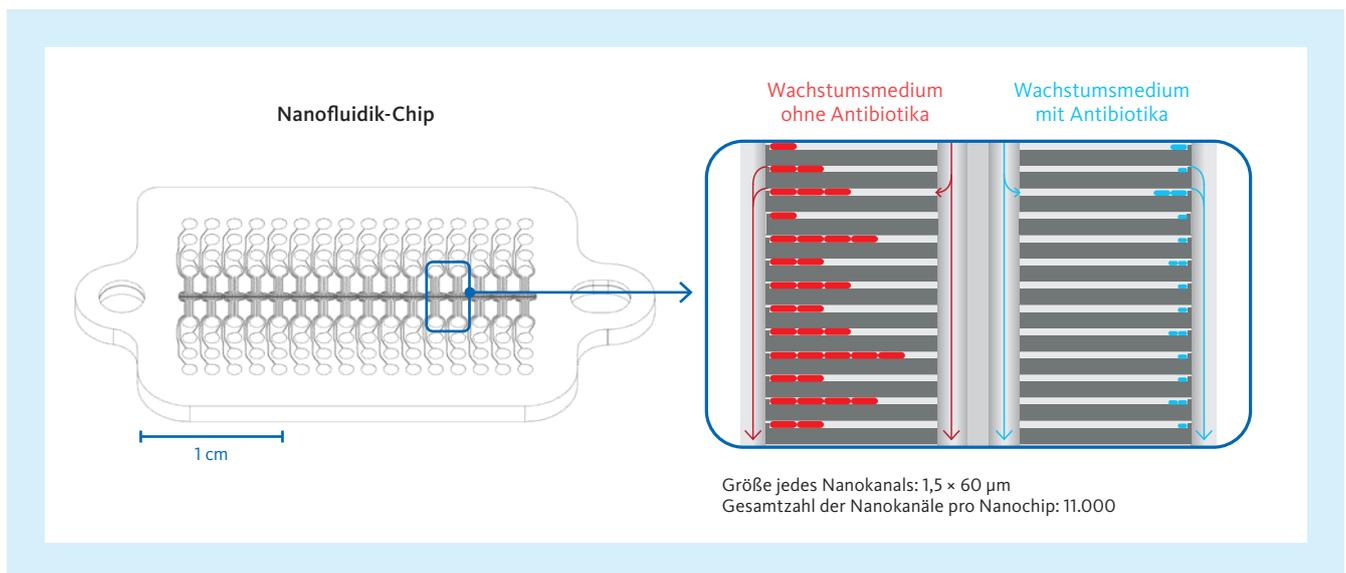


Abb. 3 Probenfluss durch das Nanokanalsystem. Auf jede Untergruppe werden unterschiedliche Bedingungen (dargestellt durch die verschiedenen Farben) angewendet.

umgebung für die Bakterien. Die einzelnen Bakterienzellen, die in den Nanokanälen gefangen sind, wachsen entlang dieser Kanäle. Da ein Nanokanal nur so breit ist, dass eine Bakterienzelle hineinpasst, bildet sich durch das Zellwachstum eine gerade Linie von Zellen, die schließlich den gesamten Nanokanal ausfüllt. Diese Geometrie bildet die Grundlage für die Messung der bakteriellen Wachstumsdynamik auf der Ebene der einzelnen Zelle.

In einem weiteren Schritt werden in verschiedenen Gruppen von Nanokanälen unterschiedliche Bedingungen erzeugt. Jede Gruppe von Nanokanälen, die aus mehreren hundert einzelnen Kanälen besteht, kann verschiedenen Bedingungen, d. h. unterschiedlichen Antibiotika und/oder Konzentrationen, ausgesetzt werden.

Dies wird erreicht, indem das Wachstumsmedium durch Reservoirs fließt, in denen verschiedene Antibiotika in unterschiedlichen Konzentrationen getrocknet vorliegen, so dass anschließend in jeder Gruppe von Nanokanälen unterschiedliche Bedingungen herrschen. Wenn ein Bakterienstamm für das Antibiotikum, dem er ausgesetzt ist, empfindlich ist, zeigen die Zellen ein verringertes Wachstum oder lysieren sogar. Resistente Bakterien wachsen und vermehren sich und füllen so den Nanokanal. Das Ausmaß, in dem die Nanokanäle bei unterschiedlichen Konzentrationen gefüllt werden, hängt vom Grad der Resistenz der Bakterien gegenüber dem Antibiotikum ab.

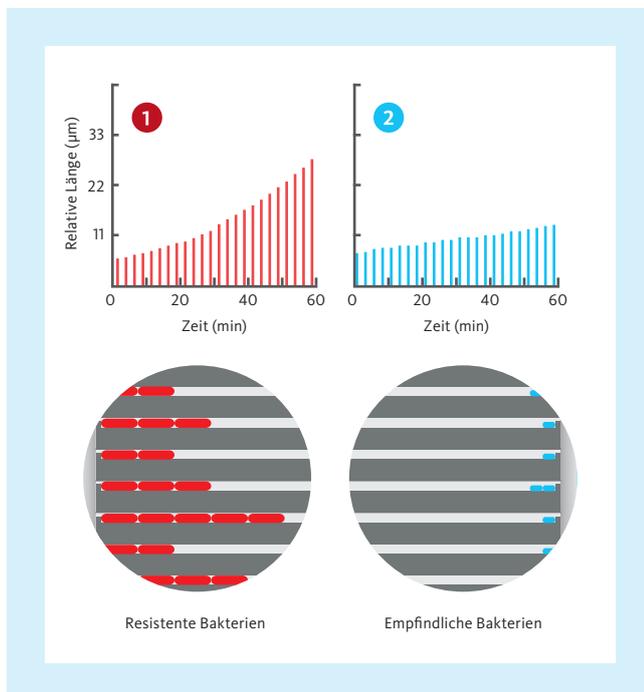


Abb. 4a Resistente Bakterien zeigen exponentielles Wachstum, wenn sie gegen das verwendete Antibiotikum resistent sind (1), während ihr Wachstum stark reduziert ist oder sogar gestoppt wird, wenn der Stamm für das getestete Antibiotikum empfindlich ist (2).

Abb. 4b Bakterien, die in den Nanokanälen wachsen. Resistente Bakterien wachsen entlang dem Nanokanal, bis dieser vollständig gefüllt ist. Empfindliche Bakterien lysieren oder zeigen eine sehr geringe Wachstumsrate.

Das System ermöglicht das parallele Testen mehrerer Antibiotika in verschiedenen Konzentrationen, die Aufzeichnung der bakteriellen Wachstumsrate in den einzelnen Nanokanälen und die Erstellung mehrerer individueller Aufzeichnungen für eine einzige Bedingung. Diese Daten werden dann verarbeitet, um einen durchschnittlichen Wachstumseinfluss für viele verschiedene Bakterien zu ermitteln, die unter denselben Bedingungen wachsen. Die Auswirkungen werden mit denen von Referenzbedingungen ohne Antibiotika verglichen, da verschiedene Proben unabhängig von der Antibiotikabehandlung unterschiedliche native Wachstumsraten aufweisen. Aus den Daten verschiedener Antibiotikakonzentrationen lässt sich dann der klinische Breakpoint der Bakterien berechnen.

Das Bakterienwachstum in solchen nanofluidischen Kanälen wird optisch mittels Phasenkontrastmikroskopie überwacht. Der Nanofluidik-Chip bewegt sich unter dem Mikroskop, um eine Reihe von Bildern zu erzeugen, die Tausende von einzelnen Nanokanälen abdecken, die den Analysebereich bilden. Der Vorgang wird alle 30 Sekunden wiederholt, was die Erstellung eines Videos zur Überwachung des Wachstums einzelner Zellen ermöglicht.

Der Datenverarbeitungsalgorithmus ist der Schlüssel zur Interpretation der Ergebnisse. Die kontinuierliche Überwachung des Zellwachstums auf Einzelzellebene beschleunigt diese Analyse im Vergleich zu herkömmlichen Bakterienkulturen dramatisch. Anstatt zu warten, bis eine Bakterienkolonie wächst, ermöglicht die Nanofluidik eine Art Wachstumsüberwachung in Echtzeit. Diese einzigartige Eigenschaft ermöglicht es, innerhalb von Minuten klinisch relevante diagnostische Ergebnisse zu erzielen – was mit anderen AST-Methoden nicht möglich ist.

Hauptvorteile der Nanofluidik für antimikrobielle Empfindlichkeits-Empfindlichkeitstests

- AST auf Basis einzelner Zellen – Wachstumsnachweis in Echtzeit
- Phänotypischer Ansatz, aber deutlich schnelleres Ergebnis als herkömmliche Kulturmethode
- Lab-on-a-Chip-Konzept – Geringerer Platzbedarf im Vergleich zur konventionellen Mikrobiologie
- Vollständig automatisierbare und standardisierte Analyse: keine Fachkenntnisse für die Anwendung erforderlich und unabhängig vom Bediener

Herausforderungen bei der Verwendung von Nanofluidik

Einige Versuche, Bakterien in mikro- und nanofluidischen Systemen zu inkubieren, sind in der wissenschaftlichen Literatur beschrieben [10]. Diese innovative Art der Zellkultur bringt einige Herausforderungen mit sich, die auf das Verhalten von Flüssigkeiten im Nanofluidik-Maßstab und die Analyse einzelner Zellen zurückzuführen sind. Eine dieser Einschränkungen ist die Schwierigkeit, einzelne Zellen im nanofluidischen System zu erfassen. In der Literatur finden sich auch hierfür einige Lösungen, von denen die meisten präanalytische Schritte wie die Vorkonzentration von Bakterienzellen beinhalten. Die zweite Einschränkung ist die unregelmäßige Konzentration von Antibiotika während der Analyse, wenn keine konstante Zufuhr von frischem Medium gewährleistet werden kann. Die letzte wichtige Einschränkung ist die Schwierigkeit, die Zellwachstumsrate mit optischen Nachweismethoden zu messen.

Die Miniaturisierung des Systems erfordert einen hohen Automatisierungsgrad, was bei der Identifizierung einiger Bakterienarten gewisse Einschränkungen mit sich bringt. Zwar kann das System so konfiguriert werden, dass es eine solide Klassifizierung bestimmter Bakterienarten ermöglicht, doch ist es nicht einfach, eine Umgebung zu schaffen, in der alle potenziellen Krankheitserreger wachsen können. Verschiedene Faktoren, wie die Zellgröße oder die erforderlichen Wachstumsbedingungen, erfordern nach wie vor die Analyse komplexer Proben in einem mikrobiologischen Labor. Das Wissen und die Vielfalt der Werkzeuge, die dem Mikrobiologen zur Verfügung stehen, werden immer noch eine wichtige Rolle spielen, und die Nanofluidik wird sie nicht ersetzen. Um eine sichere Anwendung im klinischen Kontext zu gewährleisten, ist

ein umfassender Vergleich mit Referenzmethoden erforderlich.

Aufgrund dieser Einschränkungen ist die Implementierung eines auf Nanofluidik basierenden Systems für die Durchführung von AST alles andere als eine triviale Aufgabe.

Das von uns vorgestellte System wurde entwickelt, um diese Herausforderungen zu überwinden und legt den Grundstein für ein Diagnosegerät, das diese hochempfindliche und schnelle Technologie nutzt. Die Vorteile dieses Systems liegen nicht nur in seiner Fähigkeit, einzelne Zellen zu erfassen, sondern auch in der präzisen Überwachung der Wachstumsrate der Zellen in Form von Zellteilung und Zellwachstum. Dieses System macht auch eine Vorbehandlung der Proben überflüssig.

Dies sind grundlegende Merkmale, die die Technologie näher an ein System für die medizinische Diagnostik heranführen. Diese Technologie ist ein wichtiges Instrument, um AST auch außerhalb des mikrobiologischen Labors verfügbar zu machen, was für eine beträchtliche Anzahl von Patienten eine erhebliche Verbesserung der Qualität der Diagnostik bedeutet.

Ein Blick in die Zukunft

Wie kann die Nanofluidik-basierte AST in der täglichen Praxis angewendet werden? Diese Technologie wird die Grundlage für innovative Lab-on-a-Chip-Diagnostikgeräte bilden. In Verbindung mit künstlicher Intelligenz oder wissensbasierter Software wird es möglich sein, klinisch-mikrobiologisches Wissen bis zu einem gewissen Grad zu integrieren. Durch die Entwicklung eines vollautomatischen Systems ist es möglich, die Abhängigkeit vom Bediener zu beseitigen, die für komplexe Analyseschritte bei her-

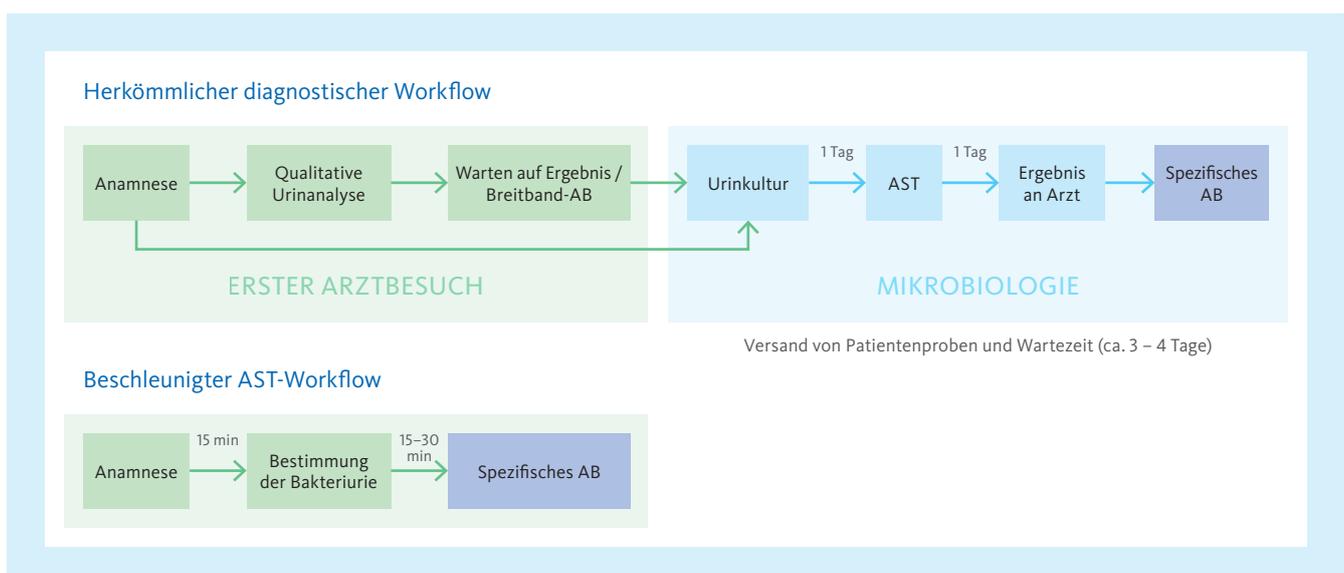


Abb. 5 Eine mögliche Anwendung dieser Technologie könnte die schnelle AST von Urinproben sein. Der derzeitige Workflow bei der Diagnose von Harnwegsinfektionen erfordert oft den Versand der Urinkultur an ein externes Labor. Die Inkubation über Nacht ist heutzutage obligatorisch. Durch den Einsatz dieser innovativen Technologie könnte die Zeit bis zur Diagnose auf weniger als eine Stunde verkürzt werden.

kömmlichen AST-Methoden typisch ist. Im Wesentlichen kann dieses Nanofluidiksystem bis zu einem gewissen Grad spezielle mikrobiologische Labormethoden auf einen Siliziumchip bringen. Eines sollte jedoch klar sein: Diese Technologien sind keineswegs dazu gedacht, mikrobiologische Labore zu ersetzen. Bestimmte Faktoren schränken ihr Potenzial ein, darunter die vielen komplexen mikrobiologischen Verfahren und die biologischen Unterschiede zwischen den Bakterienarten. Die große Anzahl potenzieller Krankheitserreger, ihr unterschiedliches Verhalten und die vielfältigen Behandlungsmöglichkeiten beschränken den Einsatz auf spezielle Anwendungen.

Die oben genannten Hauptvorteile machen diese Technologie jedoch zu einem hervorragenden Kandidaten für die Schaffung einer neuen Klasse von patientennahen Testgeräten, dank geringer Größe, Bedienerunabhängigkeit, Benutzerfreundlichkeit und schneller Ergebnisse.

Bei alltäglichen Infektionen bietet die Möglichkeit eines patientennahen Testgeräts ein einzigartiges Instrument zur Auswahl von Antibiotika, die auf die jeweilige Infektion zugeschnitten sind. Diese Informationen dem behandelnden Experten so nah am Patienten zur Verfügung zu stellen, ist der Schlüssel im Kampf gegen AMR. Schnelle AST-Ergebnisse werden es uns ermöglichen, Antibiotika mit erhöhten Resistenzraten in den Fällen einzusetzen, in denen sie noch wirksam sind, und so ihre Lebensdauer zu verlängern sowie Reserveantibiotika („letztes Mittel“) zu erhalten und die Arzneimittelkosten zu senken.

Um das Potenzial der Nanofluidik in der AST-Diagnoselandschaft zu verstehen, sollten Sie sich einige Infektionskrankheiten vor Augen führen, die aus unterschiedlichen Gründen große Aufmerksamkeit auf sich ziehen. Denken Sie zum Beispiel an den kritischen Wert der Zeit bei der Sepsis-Diagnose, wo jede Minute zählt. In einem anderen Zusammenhang könnte man eine beträchtliche Auswirkung auf die öffentliche Gesundheit sehen, wenn Blasenentzündungen – die häufigste Harnwegsinfektion und eine der häufigsten Erkrankungen, die zur Verschreibung von Antibiotika führen – mit Hilfe einer solchen Technologie in einer patientennahen Umgebung diagnostiziert würden.

Referenzen

- [1] **World Health Organisation (1978):** *Surveillance for the prevention and control of health hazards due to antibiotic-resistant enterobacteria.* WHO, Geneva.
- [2] **O'Neill JO. (2014):** *Review on Antimicrobial Resistance. Tackling a Crisis for the Health and Wealth of Nations.* UK Government, London.
- [3] **World Health Organisation (2019):** *New report calls for urgent action to avert antimicrobial resistance crisis.* WHO, Geneva.
- [4] **Centers for Disease Control and Prevention (2019):** *Antibiotic Resistance Threats in the United States.* US Department of Health and Human Services, Atlanta.
- [5] **Årdal C, et al. (2020):** *Antibiotic development – economic, regulatory and societal challenges.* *Nat Rev Microbiol* 18: 267–74.
- [6] **Puttaswamy S, et al. (2018):** *A comprehensive review of the present and future antibiotic susceptibility testing (AST) systems.* *Arch Clin Microbiol* 9 (3).
- [7] **Brito Goulart D. (2021):** *Urinary tract infection caused by antibiotic-resistant uropathogenic Escherichia coli: a major public health concern.* *Res Soc Dev* 10 (16).
- [8] **Klein A, Dietzel A. (2021):** *Microfluidic Systems for Antimicrobial Susceptibility Testing.* In: *Advances in Biochemical Engineering/ Biotechnology.* Springer, Berlin.
- [9] **Baltekin Ö, et al. (2017):** *Fast antibiotic susceptibility testing (FASTest) based on single cell growth rate measurements.* *bioRxiv.*
- [10] **Qin N, et al. (2020):** *Microfluidic technology for antibacterial resistance study and antibiotic susceptibility testing: review and perspective.* *ACS Sensors* 6 (1): 3–21.

Weitere Literatur finden Sie auf unserer Webseite unter:

www.sysmex.de/amr

www.sysmex.ch

www.sysmex.at/amr